Die vermuthliche Anwesenheit eines Alkaloid-spaltenden Ferments in Cinchona

von

J. P. LOTSY.

Ich wurde zu diesen Versuchen durch folgende Ueberlegungen geführt. Die grosse Anhäufung von Alkaloid in der Rinde der Cinchonen hat zweifellos, meiner Anschauung nach, eine physiologische Bedeutung. Die Anhäufung solcher Mengen zum Schutz gegen Insectenfrass schien — ganz abgesehen von der Thatsache, dass Cinchonen von zahllosen Raupen etc. gefressen werden — unwahrscheinlich. Ich habe mich uberhaupt nie mit dieser Anschauung als sei Schutz gegen Feinde die einzige Rolle der Alkaloiden in dem Leben der Pflanzen befreunden können. Vielmehr war und bin ich geneigt in den Alkaloiden eine Substanz zu sehen, welche entweder ganz oder theilweise wieder im Stoffwechsel verwendet werden kann.

Da fragte sich also in welcher Weise man sich dies eventuell vorstellen konnte. Es ist bekannt dass der Kern der Alkaloide in letzter Instanz auf einem Benzolkern zurück zu führen ist. Bertrand hat nun bereits darauf aufmerksam gemacht dass die Laccase am liebsten Körper mit einem Benzolkern oxydirt. Es machte mich dies an eine eventuelle Einwirkung von Oxydasen denken. Vor ich auf dieser Frage näher einging erhielt ich eine Publication von Loew in welcher er nachwies dass er mit, aus fermentirten,

Tabakblättern bereiteten, Peroxydase von Nicotine Ammoniak abspalten konnte. Ich erinnerte mich dann, dass de Vry in Cinchonarinde NH_3 gefunden hatte und es trat also die Frage an mich heran, giebt es vielleicht in Cinchonen irgend ein Ferment dass im Stande ist von den Kinaalkaloiden NH_3 abzuspalten. Falls ein solcher Ferment existirte lag einer Auffassung der Alkaloiden als Reserve-Substanz nichts im Wege. Es wurde also beschlossen die Sache experimentell näher zu treten und schritt ich also zunächst zur:

Bereitung der Peroxydase.

Ich hole aus meinen Versuchs-protocollen an:

27 Juli 1899. Bereitung von Kinaperoxydase nach der Methode von Loew zur Erhaltung von Peroxydase aus Tabak.

I. Einige (etwa 6) grosse Succirubrablätter fein geschnitten, mit Glaspulver gemischt und in einem Mortier zerrieben. Nachdem etwa der vierte Theil fein zerrieben war, 100 cc. 30 % Alcohol zugefügt und weiter gerieben. Ausgepresst, mittels einer für dergleiche Arbeit bestimmten Presse. Das Filtrat betrug 70 cc. Hinzügefügt 230 cc. Alcohol, 2 Stunden stehen lassen.

II. Zwölf grosse Succirubrablätter auf obiger Weise behandelt mit 200 cc. 30 % Alcohol.

Die von I und II erhaltene Residuen zusammen gefügt; 80 cc. H_2O hinzügefügt, die Nacht ueber stehen lassen, auf 70° C. erhitzt. Eine Minute stehen lassen, filtrirt. Filtrat dunkelbraun, dieses in 240 cc. abs. Alcohol gegossen, filtrirt, Residu gelöst in H_2O. Ein grosser Theil löst sich nicht. Filtrat im dreifachen Volum absoluten Alcohol ausgegossen und in dieser Weise aufbewahrt. Der entstandene Niederschlag ist noch braun.

3 August 1899. Der Alcohol möglichst decantirt, Rest auf einen Filter gebracht.

Ein wenig dieser Peroxydase in H_2O gelöst giebt keine Reaction mit Guajaclösung, dagegen mit Guajac-lösung + H_2O_2 eine dunkelblaue Verfärbung, während sich nach einiger Zeit ein dunkelblaues Precipitat abscheidet.

Die auf dem Filter verbliebene Peroxydase wurde sorgfältig in zwei Theilen vertheilt und jeder Theil in 50 cc. H_2O gelöst. Sie löste sich vollkommen, die Lösung war klar und schön braun.

Inzwischen waren zwei Kolben (A und B) zubereitet jeder mit einem Caoutchoucpropfen verschlössen. In diesem Propfen befand sich ein umgebogenes Glasröhrchen das mit einem doppelkugeligen Vorlage-rohr in Verbinding stand welches ein zehntel Normal Schwefelsäure enthielt.

In Flasche A wurde nun 0.5 gr. Cinchonine-tannat + 50 cc. Peroxydase-lösung geschüttet während in B, nur die Peroxydase-lösung gethan wurde.

Beide Flaschen wurden nun um 12 M. in einem Brutofen bei 55° C. gestellt. Es wurde nun nach einiger Zeit die vorgelegte Schwefelsäure mittels Nessler's Reagens auf Ammoniak [1]) untersucht und zwar mit folgendem Resultat:

	Flasche A.	Flasche B.
2 P. M.	Kein Precipitat mit Nessler.	Nicht geprüft.
5 P. M.	Schweres Precipitat mit Nessler.	Kein Precipitat mit Nessler.

Am 4ten August wurde Flasche B, während einer viertel Stunde bis 97° C. („Tötdungs"-Temperatur der Peroxydase)

[1]) Hier wird der Begriff Ammoniak ganz allgemein gefasst, inclusive seine Derivaten.

erhitzt, und danach 0.5 gr. Cinchonine-tannat zugefügt. Die Flasche wurde um 10 A. M. im Brutofen bei 55° C. gestellt und die vorgelegte Schwefelsäure um 3 P. M. mittels Nessler's geprüft. Das Resultat war ganz negativ, es entstand keine Spur eines Precipitats.

Es lässt sich hieraus nur folgendes vorläufiges Resultat ziehen:

In frischen Cinchonablättern befindet sich ein Ferment, im Stande aus Cinchonine, Ammoniak oder ein Derivat desselben ab zu spalten. Es wird dieses Ferment durch erhitzen, während 15 Minuten, auf 97° C. unwirksam gemacht.

Bereitung des Ferments aus junge Blätter von C. Succirubra.

4 Aug. 1899.	82 junge, höchstens ein drittel erwachsene Blätter werden in einem Glasmortier mit Glaspulver zerrieben. Braune Verfärbung. — Ausgezogen mit 400 cc. 30 % Alcohol, ausgepresst; der trübe Pressaft in 1200 cc. Alcohol gegossen. Nacht über stehen lassen.
5 Aug. 1899.	Alcohol decantirt, Rest auf ein Filter gebracht. Rest durch Auspressen zwischen Filtrirpapier und Exponirung an die Sonne getrocknet. Gewicht des fast trocknen Residus 7 gramm. 10 A.M. 100 cc. H_2O zugefügt und stehen lassen.
6 Aug. 1899.	(Sonntag) stehen geblieben.
7 Aug. 1899.	Während einer Minute auf 70° C. erhitzt. Filtrirt. Das Filtrat giebt keine Reaction mit Guajaclösung, dagegen wohl mit Guajac + H_2O_2; Filtrat beträgt 80 cc. Ausgegossen in 240 cc. absoluter Alcohol. Die Nacht ueber stehen lassen.

Abspaltungs-versuch mit dieser Peroxydase.

Die so erhaltene Peroxydase wurde am 9 Aug. 1899 zusammen mit 0.5 gr. Cinchoninesulfat in 50 cc. H_2O gelöst, und in einer Flasche der oben skizzirten Art, während 6 Stunden, im Brutofen auf eine Temperatur von 55° C. gehalten. Der Inhalt des Vorlage-röhrchen gab nach dieser Zeit keine Reaction mit Nessler's Reagens. Es war aber sehr möglich dass, das eventuel entstehende Ammoniak sich mit der Schwefelsäure des Cinchoninesulfats zu Ammoniumsulfat verbunden hatte und also nicht flüchtig geworden war. Um dies zu untersuchen wurde dem Inhalt der Flasche K O H zugefügt, abdestilliert, und das Destillat abgedampft, es gab dies darauf eine sehr starke Reaction mit Nessler.

Resultat:

Auch dieser Versuch deutet auf die Anwesenheit eines, von Cinchonine NH_3 abspaltendes Ferment in junge Cinchona-Blättern.

Bereitung der Peroxydase aus erwachsene Blätter von Cinchona succirubra.

4 Aug. 1899. Fünfzig erwachsene sehr grosse Blätter von C. succirubra wurden in einem Glasmortier mit Glaspulver zerrieben — keine Braunfärbung. — Ausgezogen mit 850 cc. Alcohol von 30 %, ausgepresst, Quantität Pressaft 750 cc. — Diese trübe Flüssigkeit in 2250 cc. Alcohol ausgegossen. Die Nacht ueber stehen lassen.

5 Aug. 1899. Alcohol decantirt, Rest auf ein Filter gebracht, durch pressen zwischen Filtrirpapier und nachher in die Sonne getrocknet. Gewicht des fast trocknen Residus 11 gramm. —160 cc. H_2O hinzugefügt, stehen lassen.

6 Aug. 1899. Stehen geblieben.

7 Aug. 1899. Während einer Minute auf 70° C. erhitzt. Filtrirt. Filtrat giebt keine Reaction mit Guajac-lösung. wohl aber mit Guajac-lösung + H_2O_2; Filtrat betrug 110 cc. Ausgegossen.

Abspaltungsversuch mit dieser Peroxydase.

8 Aug. 1899. Ein Theil der Peroxydase mit 0.5 gr. Cinchonine tannat

Ein Theil der Peroxydase mir 0.5 gr. Cinchonine sulfat

in 50 cc. H_2O gelöst und jeder für sich in einer Flasche obiger Art gebracht. Während 6 Stunden auf 55° C. im Brutofen gehalten. Danach KOH zugefügt und einige Augenblicke erwärmt. In beiden Vorlegeröhrchen wurde nun mit Nessler's Reagenz eine schwache NH_3 Reaction erhalten, welche zweifellos stärker gewesen wäre wenn abdestillirt war, statt nur einige Augenblicke zü erwärmen.

Auch hier wurde also NH_3 oder ein Derivat desselben abgespalten.

12 Aug. 1899. Versuch I. In einer Flasche obiger Art, wurde Peroxydase + 0,5 gr. Cinchoninesulfat gebracht. Im Brutofen 6 Stunden lang bei 55° C. stehen gelassen. KOH hinzugefügt, abdestillirt. Destillat ungefähr bis zür Hälfte eingedampft. Resultat: Nessler's Reagens giebt eine sehr schwere Reaction.

Versuch II. Controle. In einer Flasche obiger Art, wurde Peroxydase ohne Cinchoninesulfat oder irgend etwas Andrem

gebracht. Im gleichen Brutofen als n°. 1 6 Stunden lang bei 55° C. stehen gelassen. KOH hinzügefügt, abdestillirt. Destillat ungefähr bis zür Hälfte eingedampft. Resultat: Nessler's Reagens giebt auch hier eine sehr schwere Reaction.

Resultat: Auch ohne Anwesenheit von Cinchonine wird NH_3 gebildet.

Bereitung der Peroxydase aus junge Zweigspitzen.

5 Aug. 1899. Von 25 jungen Zweigspitzen wurden die Blätter entfernt und weggeworfen. Die Spitzen wurden dann in dünne Querscheiben zerschnitten und mit Glaspulver fein zerrieben. Das Zerreibsel nimmt eine schön braune Farbe an. Hinzugefügt 100 cc. 30 % Alcohol. Der Pressaft belief 150 cc. Ausgegossen in 450 cc. Alcohol. Stehen lassen bis gut abgesetzt, Alcohol decantirt, Rest auf ein Filter gebracht; durch Auspressen zwischen Filtrir-papier und später durch die Sonne getrocknet. Gewicht des fast trocknen Residus 7 gr.; hinzugefügt 100 cc. H_2O. Stehen gelassen.

6 Aug. 1899. Stehen geblieben.

7 Aug. 1899. Während einer Minute auf 70° C. erhitzt, filtrirt. Filtrat giebt keine Reaction mit Guajac, aber eine ausserordentlich schwere Reaction mit Guajac + H_2O_2. Filtrat beläuft sich auf 100 cc. In 300 cc. Alc. abs. ausgegossen, Nacht ueber stehen lassen.

8 Aug. 1899. Decantirt, Niederschlag auf ein Filter gebracht, in 2 Theilen vertheilt. Jeder Theil in 50 cc. H_2O gelöst. Von jeder Lösung auf

2 cc. mit Guajac reagirt, ohne Resultat, Guajac + H_2O_2 dagegen färbt enorm stark blau.

Abspaltungsversuch.

Es wurden beide Lösungen in je einer Flasche obengenannter Art gethan und einer dieser Kolben bei 97° C. gekocht. Danach wurde von beiden Lösungen wieder 2 cc. genommen und mit Guajaclösung + H_2O_2 geprüft. Der ungekochte Theil giebt eine starke Blaufärbung (dunkel Blaumarin), der gekochte Theil gar keine Verfärbung.

Es wurde nun in jede Flasche 0.5 gr. Cinchoninetannat gethan, und sofort die in den Vorlageröhrchen ‰ NH_2SO_4 mittels Nessler's Reagens geprüft. Es entstand keine Verfärbung. Jetzt wurde neues ‰ NH_2SO_4 in die Vorlageröhrchen gethan. Die Flaschen wurden 10 A. M. in Brutofen bei 55° C. gestellt.

Um 3 P. M. wurde mit folgendem Resultat untersucht. Es entstand in der ‰ NH_2SO_4, des gekochten Kolbens nicht die geringste Reaction mit Nessler, während das ‰ NH_2SO_4 des ungekochten Kolbens eine deutliche NH_3 Reaction gab welche aber nicht so stark als die durch Peroxydase der Blätter erhaltene war.

Bereitung der Peroxydase aus der Rinde eines alten C. Succirubra-bastes.

5 Aug. 1899. 120 gr. nasser frisch geschnittene Rinde eines alten Succirubra's wurde mit Glaspulver zerrieben, schon während des Schneidens wurden die Stückchen dunkelbraun. Hinzugefügt 400 cc. 30% Alcohol. Ausgepresst. Der Presssaft belief 330 cc. Ausgegossen in 1 L. Alcohol. Stehen gelassen bis gut abgesetzt. Precipitat sehr gering.

Alcohol decantirt; Rest auf ein Filter gebracht. Getrocknet durch Pressen zwischen Filtrirpapier. Gewicht des fast trocknen Residus: 3 Gramm, gelöst in 15 cc. H_2O; stehen gelassen.

6 Aug. Stehen geblieben.

7 Aug. Statt eine Minute bei 70°, aus Versehen bis 80° C. erhitzt. Filtrat giebt keine Reaction mit Guajac und keine mit Guajac + H_2O_2, wohl entsteht mit letzterem ein weisses Precipitat, so dass wahrscheinlich die Peroxydase „getötdet" ist.

Wiederholung der Bereitung.

7 Aug. 65 gr. nasse frisch geschnittene Stücke der Rinde desselbes Baumes mit Glaspulver zerrieben. Stücken werden schon während des Schneidens dunkelbraun. Hinzu gefügt 100 cc. 30% Alcohol. Ausgepresst. Die Pressung gelang nur unvollständig, so dass nur 40 cc. Presssaft entstand. Dieser Pressaft mit Wasser verdünnt, gab mit Guajac-lösung keine Verfärbung, dagegen wohl eine blaue Farbe mit Guajaclösung + H_2O_2.

Die Peroxydase findet sich also auch in der Rinde.

Prüfung der angewandten Reagentien auf NH_3.

Das Resultat von S. 6, wo die Peroxydase ohne Cinchonine und ohne jeglicher andren absichtlich beigemischten Substanz NH_3 liefert kann seinen Grund haben in:

1. Unreinheit der Reagentien.
2. Anwesenheit von Cinchonine in der Peroxydase.

3. Anwesenheit von anderen N-haltigen Substanzen in der Peroxydase welche in NH_3 umgesetzt werden.
4. Anwesenheit von NH_3 in der Peroxydase.
5. Bindung von freiem Stickstoff durch die Peroxydase (höchst unwahrscheinlich).

14 Aug. Probiren der Reagentien.

I. Ein Schälchen voll aq. dest. kalt: keine Reaction mit Nessler.

II. Ein Schälchen voll aq. dest. bis zur Hälfte eingedampft: keine Reaction mit Nessler.

III. Ein Schälchen voll aq. dest. bis zu einem Tropfen eingedampft: keine Reaction mit Nessler.

IV. Ein Schälchen voll aq. dest. + einige cc. $\frac{1}{10}$ normal H_2SO_4 bis zu einem Tropfen eingedampft: Aüsserst geringe Reaction mit Nessler.

V. Ein Schälchen voll aq. dest + KOH, stark eingedampft, giebt keine Reaction mit Nessler.

Es wurde jetzt in einer Flasche wie der von S. 3. Aq. dest. + KOH + ein Stückchen Zink gethan. Gekocht, destillirt und das Destillat im $\frac{1}{10}$ NH_2SO_4 aufgefangen. Dieses bis zur Hälfte eingedampft. Nessler giebt nicht die geringste Reaction.

Es ist demnach ausgeschlossen die Thatsache van S. 3 wo die Peroxydase allein ein Destillat ergab, das nach halber Verdunstung ein enorm schwere Reaction mit Nessler gab, durch NH_3-haltigkeit der verwendeten Reagentien zu erklären.

Die Erklärung dieses Verhaltens muss also in einer der folgenden Möglichkeiten gefunden werden:

I. Anwesenheit von NH_3 in der Peroxydase.

II. „ „ „ in der Cinchonine.

III. „ „ andren N-haltigen Substanzen in der Peroxydase; welche in NH_3 umgesetzt werden.

IV. Bindung freien Stickstoffs durch die Peroxydase (höchst unwahrscheinlich.)

Leider hat Verf. diese Fragen nicht weiter verfolgen kön-können; und sind also weitere Versuche im höchsten Grade erwünscht. Ich muss aufs bestimmteste betonen, dass ich diese, nicht abgeschlossene, Versuche nicht publiciren würde, falls ich beabsichtigte in absehbarer Zeit nach Java zurück zu kehren. Da dieses nicht der Fäll scheint mir ihre Veröffentlichung geboten, damit ein Andrer sie aufnehmen und begründen oder verwerfen kann.

Leiden, Sept. 1904.
